



TITLE:

# Structural studies on regulating mechanism of coenzyme A biosynthesis in archaea( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Aikawa, Yoshiki

---

CITATION:

Aikawa, Yoshiki. Structural studies on regulating mechanism of coenzyme A biosynthesis in archaea. 京都大学, 2016, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2016-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19883>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2017-03-01に公開; 許諾条件により要旨は2016-07-01に公開

京都大学	博 士 ( 理 学 )	氏名	相川 佳紀
論文題目	Structural studies on regulating mechanism of coenzyme A biosynthesis in archaea (アーキアにおける補酵素A生合成の制御機構に関する構造生物学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>補酵素A (CoA) は全ての生物種において中心的な役割を持つ代謝産物であるが、その合成経路については細菌や真核生物ではよく研究されている。一方、アーキアでは、細菌等で CoA の前駆体合成に関与し CoA によって阻害を受ける pantothenate kinase が存在せず、2-oxopantoate を D-pantoate に還元する ketopantoate reductase (KPR) が CoA による阻害を受ける。本研究では、X線結晶構造解析を主な手法として、アーキアの KPR に対する CoA のフィードバック阻害機構を明らかにする。</p> <p>超好熱性アーキア <i>Thermococcus kodakarensis</i> 由来 KPR (Tk-KPR) に CoA および 2-oxopantoateが結合した複合体の結晶構造を1.65Å分解能で決定した。Tk-KPRのサブユニット構造はN末ドメインとC末ドメインからなっており、C末ドメインどうしの相互作用によって二量体構造をとっていた。非等価な二量体を形成する二つのサブユニットのうち一方には NADP<sup>+</sup> が結合しており (molA)、もう一方にはCoA と 2-oxopantoateが結合していた (molB)。これらのサブユニット構造を比較したところ、molB は molA よりも閉じた構造をしていた。このことから、CoA と 2-oxopantoate が同時に結合することで活性部位が閉じることが分かった。さらに、CoA は補因子であるNAD(P)H結合部位に結合しており、CoA が NAD(P)H と競合することで活性阻害が起こるものと考えられる。CoA の結合にのみ関与すると思われる残基は、CoA による阻害を受けない大腸菌由来 KPR では保存されていないこともわかった。これら残基の変異体の活性阻害効率はわずかに低下しており、CoA の結合に協同的に関わっていることが示唆された。また、CoA は Cys84 とのジスルフィド結合によって Tk-KPR から解離できず、厳密で持続的な阻害を達成していると考えられる。また、N末ドメインとC末ドメインの間に CoA と 2-oxopantoate が協同的に結合することで molB が閉じた構造をとると考えられる。Tk-KPRの阻害機構をさらに詳しく調べるために、Tk-KPR (C84A変異体) をNADHおよび 2-oxopantoate と共結晶化し、2.3 Å分解能で構造を決定した。この結晶は先のCoA と 2-oxopantoate との複合体とは異なる空間群であるにもかかわらず同じ二量体構造であった。このことは Tk-KPR の二量体構造が結晶化の影響によるものではないことを示している。この構造では、二つのサブユニットの両方に NADP<sup>+</sup> だけが結合しており、サブユニットの構造はほぼ同じであった。さらにこの構造を CoA と 2-oxopantoate との複合体の構造と比較すると、C末ドメイン間の二量体相互作用に関わる残基の位置に変化はなかった。二量体はC末ドメインのみで接触しているため、CoA と 2-oxopantoate が結合するサブユニットは、もう一方のサブユニットには影響を与えないと考えられ、Tk-KPR 二量体の二つのサブユニットは独立に CoA による阻害を受けることが示唆される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

全ての生物種において重要な役割を担っている補酵素 A (CoA) の生合成経路は、CoA によるフィードバック阻害によって制御されている。最近、アーキアにおける CoA の生合成は、これまで知られていた細菌や真核生物のものと異なり、CoA の前駆体合成に関与し、NAD(P)H を補因子として 2-oxopantoate を D-pantoate に還元する ketopantoate reductase (KPR) がフィードバック阻害の対象となることが明らかになった。本研究は、アーキアにおいて初めて発見された CoA による KPR の阻害機構に着目し、CoA が結合した KPR の結晶構造を決定して、その分子機構を原子レベルで明らかにしようとしたものである。

まずは、超好熱性アーキア由来 *Thermococcus kodakarensis* 由来 KPR (Tk-KPR) を発現・精製し、CoA と 2-oxopantoate との三者複合体の結晶を得て、1.65 Å 分解能での構造決定に成功している。その結晶構造から、NAD(P)H の結合部位に CoA が結合することによって競合阻害が生じることを明らかにしている。また、CoA と 2-oxopantoate がともに結合することによって、閉じた構造へと変化し、CoA の結合を強固にすることが示唆されている。CoA の結合に関与する残基のいくつかは、CoA による阻害を受けない大腸菌由来の KPR には保存されていないことから、それら残基の重要性を提唱するとともに、変異体を用いた活性阻害実験によってそれを検証している。特に Cys84 は結晶構造中で CoA とジスルフィド結合を形成しており、厳密で持続的な阻害に寄与していることが示されている。続いて、Tk-KPR の阻害機構をさらに詳しく調べるために、Tk-KPR (C84A 変異体) の NADH および 2-oxopantoate との共結晶について、その結晶構造を 2.3 Å 分解能で決定している。この構造を CoA と 2-oxopantoate との複合体構造と比較することで、二量体の相互作用様式に変化が見られないことを検証し、二つのサブユニットが独立に阻害を受ける反応機構を提唱している。これら Tk-KPR の結晶構造解析ならびに生化学実験の結果は、アーキアに固有な CoA の生合成経路ならびにその新規フィードバック阻害機構について分子レベルでの理解を与えるものと評価される。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成 28 年 3 月 17 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認められた。